

論文内容の要旨

獣医学専攻

平成 12 年度博士課程入学

氏名 HANG THI THU PHUNG

(ハン チィ トゥ フン)

指導教官氏名 明石 博臣

Studies on Genetic and Antigenic Characterization of Feline Foamy Virus (ネコフォーミーウイルスの遺伝学的性状および抗原性に関する研究)

フォーミーウイルス (FV) はスプーマウイルスとも呼ばれるレトロウイルスの一種で、1950 年代にサルの腎臓培養への混入により発見された。FV 感染培養細胞には特徴的な泡状の変化が認められ、フォーミー (Foamy) の名の由来となっている。その後、様々な新および旧世界サル、ネコ、ウシなどからも FV は分離されている。FV はレトロウイルスのなかでも特異な性状を有するグループであることが、近年明らかとなっている。そのゲノムはレトロウイルスの中で最大で、特有の調節遺伝子も有し、ゲノム末端の LTR 領域に加え *env* 遺伝子中にもプロモーター領域が存在している。さらに、*pol* 遺伝子の転写制御も他のレトロウイルスと異なっていることも示されている。

ネコフォーミーウイルス (FeFV) も基本的な性状は他の FV と同一であり、多数の株が病気の有無にかかわらず、ネコの様々な臓器、血液、唾液から分離されている。感染は唾液由来のウイルスによる接触感染で、別のレトロウイルスであるネコ免疫不全ウイルスが咬傷などの皮下への暴露が重要なものに対し、比較的軽い接触でも感染が成立すると考えられている。FeFV に感染するとネコは持続感染状態となり、生涯ウイルスを体内に保有するが、特定の病気との関連は証明されていない。日本と台湾における血清疫学調査では 13.7% から 28% の陽性率で、オーストラリアの調査では 70% に

及ぶことが報告されており、FeFV は世界中のイエネコ並びに野生ネコに広く存在すると考えられている。

今日、FeFV は非病原性と考えられており、広い宿主域とゲノムの大きさから遺伝子治療用のベクターとして注目されているが、FeFV には未解明の性状が多く残されている。本研究では、ベクターとしての基本的性状のうち FeFV の遺伝学性状および抗原性に着目し、世界各地のイエネコおよび野生ネコから分離された FeFV の遺伝学的性状の解析、感染性を正確に測定するための細胞の開発並びにそれを応用したウイルス中和にかかわる抗原性状の解析を行った。

第一章 異なる地域のイエネコおよび野生ネコ類から分離されたネコフォーミーウイルスの遺伝学的解析

サル類由来 FV の場合は 10 の血清型が知られており、概ね由来サル種に一致すると考えられている。FeFV においては 2 つの血清型 (serotype) が存在し、近年のオーストラリアおよび米国のイエネコ分離株を用いた遺伝子解析の結果では、*env* 遺伝子により 2 つの異なる genotype (F17-type と FUV-type) に分けられることが示されている。一方、日本、台湾、ベトナムおよびアルゼンチンのイエネコ、さらに日本のイリオモテヤマネコとベトナムのベンガルヤマネコからも FeFV が分離されているが、その遺伝学的解析はなされていない。そこで、FeFV の遺伝学的多様性と系統発生学的関連を解明するために、これら分離株の各種遺伝子領域の塩基配列を決定してオーストラリアおよび米国分離株との比較を行った。

イエネコ由来 13 株、ヤマネコ由来 4 株の FeFV のプロウイルス DNA を抽出し、4 つの遺伝子領域について、PCR 法により増幅を行った。全ての株について増幅が可能でそのサイズも大きな差は認められなかった。そこで、LTR、*gag*、*env* 遺伝子の部分領域の塩基配列を決定した。LTR および *gag* 領域の系統発生学的解析では概ね由来地域でグループを形成する傾向が認められたのに対し、*env* 領域の比較では 2 つの genotypes に分かれることが確認された。genotype 間での塩基配列の相同性が約 75% であるのに対し、genotype 内での相同性は 95% 以上であったが、地域性との関連は見出されなかった。以上のことから、イエネコの祖先は世界中に広がる前に 2 つの genotypes の FeFV を有していた可能性が推定された。また、ヤマネコ由来 FeFV もイエネコ由来のものから独立したグループを形成する傾向は認められなかった。

第二章 ネコフォーミーウイルスの定量のための GFP を利用したウイルス検出用細胞株の開発

FeFV は主にネコ由来細胞培養で細胞変性効果 (CPE) を示しながら増殖するので、CPE を指標とした感染価の測定が可能である。しかし、そのためには1週間以上の長い日数と多くの労力が必要であることに加え、CPE を示さずに持続感染状態になることもあるため、CPE を指標とした感染価測定には限界がある。そこで、FeFV の感染性を短時間で正確に定量するために β -galactosidase 遺伝子を LTR の下流に組み込んだ遺伝子を導入した細胞が開発されているが、細胞を固定して発色させることが必要なため生きた状態の細胞では定量することはできない。本章においては FeFV の感染を迅速かつ簡便に検出するため、FeFV 感染時に緑色蛍光色素 (GFP) を発現するネコ由来細胞の樹立を試みた。

GFP 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を保持するプラスミドの GFP 遺伝子上流に FeFV 感染時に活性化する LTR を組み込み、ネコ腎由来株化細胞である CRFK 細胞に導入した。選択薬剤の G418 存在下で CRFK 細胞を培養し、コロニーを形成した細胞をクローニングした。クローン化した細胞のうち 3 クローンに、FeFV 感染下で GFP の発現が蛍光顕微鏡観察により認められた。さらにクローニングを繰り返して、安定な GFP 導入 CRFK 細胞が得られたので FFG 細胞と名付け、その FeFV 感染の検出における有用性を検討した。

FFG 細胞に FeFV を感染させると CPE の有無にかかわらず GFP の強い発現が認められた。感染価の測定に応用した場合には 3 または 4 日でプラトーに達し、測定を終了することが可能であった。感染価は従来法と比較して 3~10 倍高く、感度も高いことも示された。本法の応用として各種動物とヒト由来の細胞に FeFV を感染させた時の培養上清中のウイルス産生量を定量したところ、従来知られていたネコ、イヌおよびヒト由来細胞に加え、新たにニワトリ並びにコウモリ由来の細胞でも増殖が可能であることが示された。

第三章 感染ネコ血清とモノクローナル抗体を用いたネコフォーミーウイルスの中和抗原性の解析

FeFV には中和試験で区別される 2 つの血清型が知られている。一方、第一章で示された 2 つの *genotypes* の中和抗原性については不明の点が多い。そこで、前章で開発した FFG 細胞を応用した中和試験により、日本、ベトナムおよびアルゼンチン分離株の中和抗原の解析を行った。

FeFV が分離されたネコの血清を用いて、両 *genotype* を含む分離株との交差中和試験をおこなったところ、抗 VN114 株血清と抗 Ar20 血清は用いた全てのウイルスを中和したのに対して Sammy-1 株を実験感染させたネコ血清は同一の *genotype* (F17-type) のウイルスのみを特異的に中和した。一方、3 つの血清サンプルにおいては中和活性が認められなかった。日本およびベトナムの野外ネコ血清の調査においては、陽性例は全てどちらかの *genotype* のみを中和した。さらに、中和試験に補体の添加を試みたところ、*genotype* に特異的な中和活性の著しい上昇が認められ、陰性であった上記血清 3 サンプルについても分離ウイルスの *genotype* に一致する中和活性が確認された。従来、*genotype* 間では重複感染はないものと考えられていたが、両 *genotype* の FeFV を中和する血清が見つかったことから、重複感染の可能性が示された。また、マウスを FeFV で免疫して中和モノクローナル抗体(mAb)の作出も試みたところ、FUV-type に特異的な中和活性を有する mAb が得られた。本 mAb は免疫沈降反応で Env タンパクと反応性を示し、今後の Env タンパクの抗原解析に有用と考えられた。

本研究により、FeFV は *env* 遺伝子により由来ネコの種類にかかわらず、2 つの *genotypes* に大別されることが明らかとなった。また、旧来示されていた *serotype* は *genotype* に一致することも示されるとともに、従来認められていなかった *genotype* 間の重複感染の可能性も示唆された。加えて、本研究により開発された GFP 細胞により、一週間以上を要する FeFV 感染価の測定を数日で行うことが可能となった。以上の成果は今後、FeFV の持続感染に対するネコの免疫応答の解明並びに FeFV のウイルスベクターとしての開発研究に貢献するものと考えられる。